

环境因子对溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)粘附 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)表皮粘液 影响的研究*

陈 强^{1,2} 鄢庆枇^{2,3} 邹文政² 马 牲¹ 庄峙厦³ 王小如³

(1. 中国海洋大学水产学院 青岛 266003; 2. 集美大学水产学院 厦门 361021; 3. 厦门大学化学化工学院 厦门 361005)

提要 采用 ³H-TdR 同位素示踪方法研究了环境因子对溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液粘附作用的影响。试验结果表明,溶藻弧菌能很好地粘附于大黄鱼表皮粘液,其粘附量在菌浓度不超过 6.52×10^8 cfu/ml 情况下随菌浓度的升高而升高,粘附量在 25 ℃ 下孵育 180min 趋于饱和,在 180min 以内与孵育时间呈正相关关系;粘附作用在温度 25—30 ℃、pH 值偏酸、盐度 35 条件下较强;在无 Na⁺(盐度为 0)时,无粘附作用;Ca²⁺能显著加强溶藻弧菌的粘附作用,而 Mg²⁺作用不明显。这些结果表明,溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液有较强的粘附作用,其粘附作用受温度、盐度、pH 值等环境因子的影响。

关键词 溶藻弧菌,粘附作用,大黄鱼,表皮粘液

中图分类号 S432.1

大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)是我国近海特有的主要经济鱼类和当前最主要海水养殖鱼类、我国六大优势出口水产品之一。目前随着养殖规模的不断扩大,各种病害的发生也日趋频繁,其中由溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)引起的疾病,发病率高、流行范围广,造成的经济损失巨大(林克冰等,1999;鄢庆枇等,2001)。

病原菌对鱼类的感染途径很多,已报道了消化道、鳃、表皮可能是细菌的侵染部位(Chabrilion *et al.*, 2004(房海等,2005;陈翠珍等,2006))。鱼体的消化道、鳃、表皮上分布的粘液层是鱼类非特异性防御机制之一(John *et al.*, 1992),病原菌对机体的侵染必须以通过这道防御屏障作为前提,因此病原菌对粘液有效的粘附是其对机体致病所必

须的,其粘附的能力是病原菌的毒力因子之一(Beachey, 1981)。虽然,病原菌对鱼体粘液的粘附在侵染过程中起着重要的作用,但相关研究却非常少。目前国外仅有少数人初步研究了常见致病性弧菌对金头鲷(*Sparus aurata* L.)表皮、鳃、肠道等粘液的粘附情况(Chabrilion *et al.*, 2004; Bordas *et al.*, 1996),国内还未见相关的研究报道。

环境因子是决定病原菌对宿主感染结局的主要因素之一,对病原菌及宿主都有着重要影响。作者以从患病大黄鱼中分离并鉴定的病原菌-溶藻弧菌作为研究对象,研究其对大黄鱼表皮粘液的粘附情况,探讨几种环境因子对其粘附的影响,以期阐明溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液的粘附规律,也为今后进一步研究溶藻弧菌对大黄鱼的致

*国家 863 计划项目资助,2001AA635070 号、2002AA639600 号;福建省自然科学基金资助, B0410022 号。
陈 强, E-mail: qiangchen@hotmail.com

通讯作者:鄢庆枇,博士,副教授, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

收稿日期:2006-09-20, 收修改稿日期:2006-12-04

病机理奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)为患病大黄鱼中分离的病原菌株,保存于本实验室的-80超低温冰箱。大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)购自厦门刘五店养殖网箱,选择外观无伤、正常摄食、体重300—500g的50尾个体。

³H-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR)购自中国科学院应用物理研究所,放射性比活度为30Ci/mmol,放射性浓度1mCi/ml。

闪烁液:6g/L 2,5-二苯基 唑(PPO, 购自Sigma); 0.1g/L 1,4-双-[5-苯基 唑基-2]-苯(POPOP, 购自中国科学院应用物理研究所)溶于二甲苯、无水乙醇混合液(V/V, 3:2)中。

1.2 试验方法

1.2.1 大黄鱼表皮粘液制备 参考 Bordas 等(1996)方法,用钝塑料片刮取大黄鱼表皮背部粘液,然后放入灭菌海水中混匀;在4℃、20000g条件下离心2次,每次30min,以去除颗粒物;然后依次用0.45μm、0.22μm滤膜过滤除菌。利用Bradford法测定所制备粘液的蛋白含量,将蛋白含量调整到1000μg/ml左右保存于4℃冰箱待用。

1.2.2 菌株培养及放射性标记 用2% NaCl胰蛋白胨大豆培养基(TSB)培养溶藻弧菌。每毫升培养液加入10μl ³H-TdR, 25℃培养12h后在4℃、2000g条件下离心10min收集菌体,然后以0.85%无菌生理盐水清洗2次,将菌浓度调整到10⁸cfu/ml左右待用。

1.2.3 标记菌的放射活性与菌浓度的关系 将标记的菌悬液 OD₅₅₀ 调至 0.022(1.29 × 10⁷cfu/ml), 然后进行2倍梯度稀释7次,取150μl稀释菌液进行放射活性测定,以1% SDS、0.1mol/L NaOH溶液作为空白对照,比较放射活性与菌浓度的关系并得出此方法的最低检测限。

1.2.4 体外粘附试验 参考 Vesterlund 等(2005b)方法,取96孔酶标板,每孔加入150μl表皮粘液,4℃包被18—20h后弃去残留粘液,用200μl无菌海水清洗2次;加入150μl已放射性标记的菌(10⁸cfu/ml左右),25℃孵育90min;然后用0.85%无菌生理盐水清洗2次除去未粘附的

菌;加入150μl 1% SDS-0.1 mol/L NaOH溶液,60℃保温1h,以回收粘附的菌体;将回收液加入20ml闪烁瓶中,测定前12h加入10ml闪烁液,用液体闪烁计数仪(Packard Tri-Carb 4640)测定放射活性(dpm)。

1.2.5 不同孵育时间对溶藻弧菌粘附的影响 按1.2.4的方法进行,将孵育时间设定为15、30、45、60、90、120、150、180、240min,观察时间对细菌粘附量的影响。

1.2.6 不同菌浓度对溶藻弧菌粘附的影响 按1.2.2方法制备菌悬液,将菌悬液 OD₅₅₀ 调至为1.11(6.52 × 10⁸cfu/ml)、0.815、0.54、0.315、0.17、0.084、0.044等梯度,按1.2.4的方法进行粘附试验。

1.2.7 不同理化因子对溶藻弧菌粘附的影响

(1) 温度对粘附的影响 按1.2.4的方法进行试验,孵育温度设定为4、8、15、25、30、37、44℃,比较不同温度下的粘附情况。

(2) pH对粘附的影响 用3、4、5、6、7、8、9等不同pH值的0.01mol/L PBS制备菌悬液,然后按1.2.4的方法进行粘附试验。

(3) 盐度对粘附的影响 利用蒸发或稀释的方法将天然海水(盐度为23.5)调至盐度分别为45、35、25、15、5,然后用不同盐度的海水制备菌悬液。另外以去离子水制备菌悬液进行无离子状态(盐度为0)下的粘附试验,然后按1.2.4的方法进行粘附试验。

(4) 二价阳离子对粘附的影响 用生理盐水配制0.01mol/L的CaCl₂、MgCl₂溶液,制备菌悬液。以生理盐水作对照,然后按1.2.4的方法进行粘附试验,比较Ca²⁺、Mg²⁺对细菌粘附的影响。

1.2.8 数据处理 试验每一处理均设3组平行,结果以平均值±标准差表示,采用EXCEL、SPSS进行统计学分析。

2 结果

2.1 标记菌的放射活性与菌浓度的关系

将细菌的放射活性及浓度分别取对数后作图,由图1可知,两者存在线性关系($R^2=0.9891$),随着菌浓度的升高其放射性活性也升高,因此通过测定放射性活性可反映细菌量,进而了解细菌的粘附量。图中横线表示空白样的放射性活性,与最高稀释度的细菌数量 1.51×10^4 cfu接近,因此本方法的最低检测限约为 10^4 cfu。

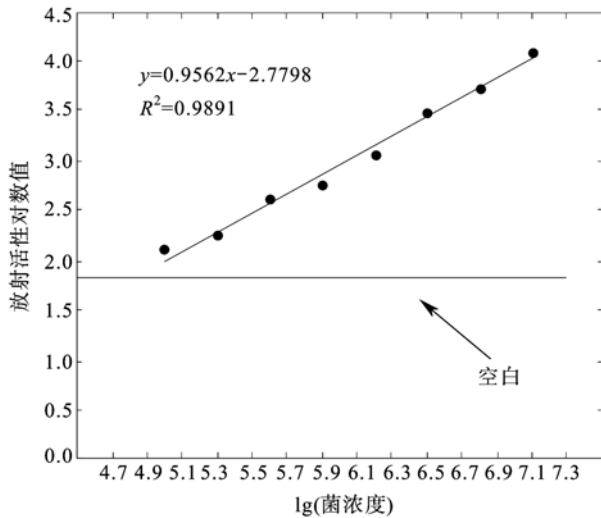


图1 标记菌的放射活性与菌浓度的关系

Fig.1 Relationship of radioactivity of labeled bacteria to bacterial concentration

注: 图中纵坐标及横坐标的值代表放射活性和菌浓度以10为底的对数

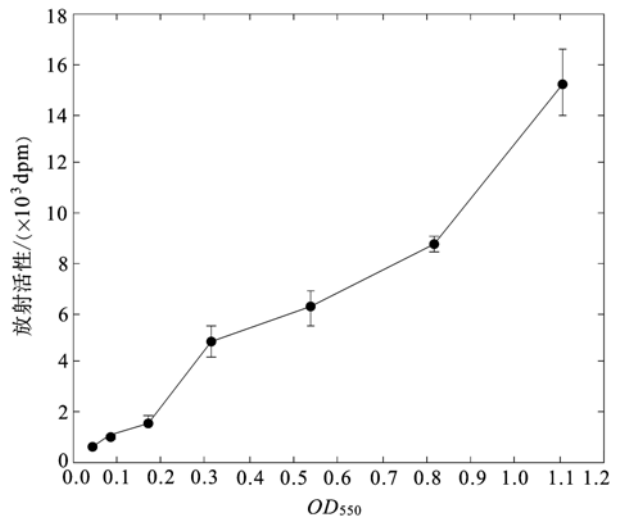


图3 菌浓度与粘附量的关系

Fig.3 Relationship of adhesive bacteria and bacterial concentration

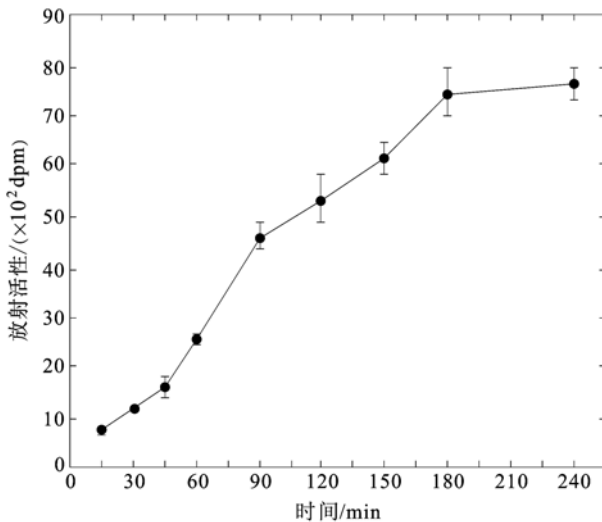


图2 孵育时间对溶藻弧菌粘附的影响

Fig.2 Influence of incubation time on adhesion of *V. alginolyticus*

2.2 孵育时间及菌浓度对细菌粘附的影响

溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液的粘附量随孵育时间的延长而增加, 孵育 180min 时粘附量趋于饱和(图 2), 饱和时的粘附量约为 9.07×10^6 cfu(相当于 7.26×10^4 cfu/mm²); 细菌粘附量与菌浓度也成正比关系, 随浓度的升高而增加, 在孵育 90min 条件下, 菌液 OD₅₅₀ 在 0.044—1.11 范围内无饱和现象(图 3)。

2.3 不同理化因子对细菌粘附的影响

孵育温度在 8—25 间溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液的粘附量随温度升高而增多, 在 8—30 间各实验组粘附量无显著差异; 孵育温度升高到 37—44 时, 溶藻弧菌的粘附量明显降低; 25、30 两试验组与 37 及 44 分别存在极显著 ($P < 0.01$) 或显著差异 ($P < 0.05$), 8、15 两试验组与 37 存在显著差异 ($P < 0.05$), 与 44 无显著差异, 因此通过差异比较孵育温度 25—30 时溶藻弧菌粘附作用较强; 4 时的粘附量最大(图 4)。

图 5 为 pH 值对细菌粘附情况影响的结果, pH 值为 3—6 时溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液有较强的粘附, pH 值为 6 时粘附作用最强, 经 *t* 检验, pH 值为 6 时的粘附量与 pH 值为 3、4、5 三个试验组的粘附量之间均存在显著差异 ($P < 0.05$); 当 pH 值为 7—9 时, 溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液的粘附量明显下降, pH 值为 7、8、9 三个试验组的粘附量与 pH 值为 6 时的粘附量存在极显著差异 ($P < 0.01$)。

盐度对溶藻弧菌粘附作用的影响结果见图 6, 纯水(盐度为 0)试验组的放射活性接近空白对照组, 说明在此条件下几乎无粘附作用。盐度在 5—45 间, 粘附作用无明显的梯度关系, 在盐度 35 时溶藻弧菌粘附量最大, 与盐度 15、45 存在显著差异 ($P < 0.05$), 与盐度 25 存在极显著差异 ($P < 0.01$), 但与盐度 5 条件下的粘附量无显著差异。

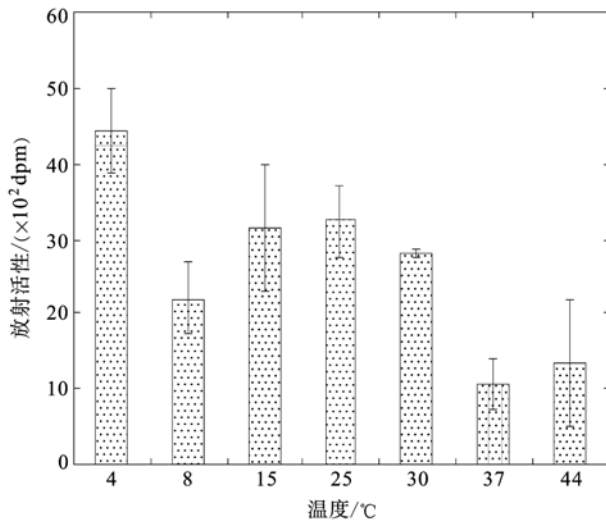


图4 孵育温度对溶藻弧菌粘附的影响

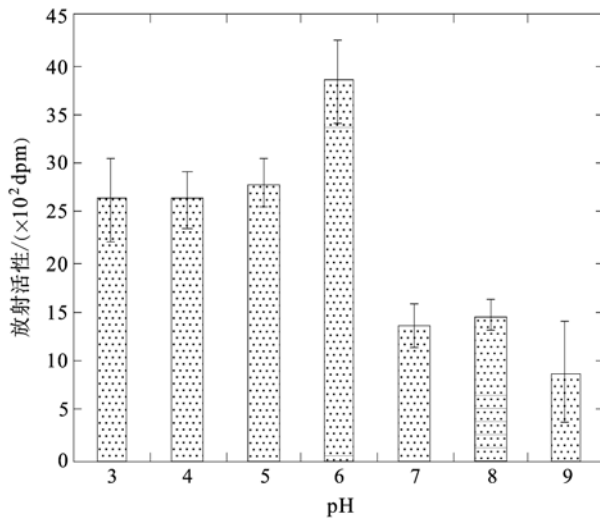
Fig.4 Influence of temperature on adhesion of *V. alginolyticus*

图5 pH值对溶藻弧菌粘附的影响

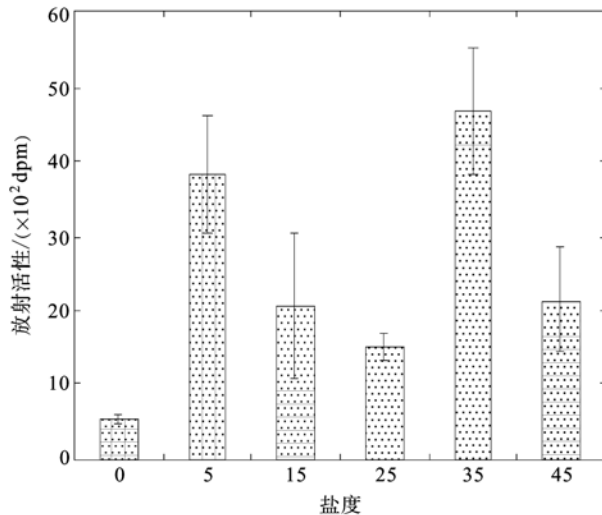
Fig.5 Influence of pH on adhesion of *V. alginolyticus*

图6 盐度对溶藻弧菌粘附的影响

Fig.6 Influence of salinity on adhesion of *V. alginolyticus*

二价阳离子对细菌粘附作用的影响以(平均值 \pm 标准偏差)表示,结果分别为:Ca²⁺组的放射活性为 6037.21 ± 618.28 ,Mg²⁺组及对照组的放射活性分别为 4206.83 ± 444.23 和 3566.52 ± 247.10 ,Ca²⁺组与Mg²⁺组及对照组有显著差异($P < 0.05$)。Ca²⁺的存在能显著地增强溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液的粘附作用($P < 0.05$)。Mg²⁺的存在虽然能使溶藻弧菌的粘附量略高于对照组,但两组之间并无显著差异($P > 0.05$)。

3 讨论

鱼类的粘液除了能减少鱼类游泳时的阻力(Rosen *et al.*, 1971)和调节渗透压(Johnson, 1973)外,还对机体有一定的保护作用(Ebran *et al.*, 1999),能够阻止某些病原菌的定植(Fouz *et al.*, 1990)。在粘液中有IgM、溶菌酶、抗菌蛋白等抗菌物质,能够抑制或杀灭一部分病原菌(Ebran *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000)。同时,有的病原菌有可能利用粘液中的营养成分,在粘液中生长繁殖,以利于进一步侵入和释放毒素(Garcia *et al.*, 1997)。因此粘液在鱼类抗感染免疫中发挥着重要的作用。所以研究病原菌对粘液的粘附作用是研究病原菌致病机理的重要组成部分。特别是大黄鱼产生的粘液量很大,研究病原菌对其粘液的粘附作用显得尤为重要。

对细菌体外粘附分析的方法有多种,如显微镜直接计数、扫描电镜观察、CFU平板计数及放射性标记法等等(Yuehuei *et al.*, 1997)。Vesterlund等(2005b)通过试验比较了显微镜直接计数法,荧光强度测定及放射性测定等间接法,认为放射性测定法的偏差小、重复性强。另外,本试验采用酶标板进行粘附试验,与采用载玻片直接计数(Bordas *et al.*, 1996)相比,大大提高了效率。

多数细菌对宿主表面的粘附需要细菌表面粘附结构-粘附素与宿主表面的特异受体特异性结合来完成(戴卓捷等, 2001),随粘附量的增加宿主表面的受体趋于饱和,粘附量也趋于平衡。Vesterlund等(2005a)研究表明,沙门氏菌(*Salmonella enterica serovar Typhimurium*)对人肠粘液的粘附量5h达到饱和,本试验结果显示孵育180min时溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液的粘附量就达到饱和,饱和时的粘附量相当于 7.26×10^4 cfu/mm²。这说明了溶藻弧菌对大黄鱼表皮粘液的粘附亲和力较强,粘附量较大。由此可以反映溶

藻弧菌对大黄鱼有较强的侵染能力。

病原菌对宿主感染致病主要由病原菌、宿主、环境三大因素决定。温度、盐度、pH是水环境的重要因子,因此通过研究这些因子对溶藻弧菌粘附作用的影响可初步了解环境因子在溶藻弧菌对宿主粘附中所起的作用。

溶藻弧菌为嗜温菌,适宜生长温度为17—35(Stefan *et al.*, 2000), Bordas 等(1996)试验表明在盐度为10,温度为22、27条件下溶藻弧菌对黑鲷表皮粘液有较强的粘附作用,这与本试验结果相似,这正反映了当溶藻弧菌有较强活力时对宿主有较强粘附作用,所以这可能是溶藻弧菌对大黄鱼致病多发生在水温较高的春夏季的原因之一。溶藻弧菌通常在水温5以上时才可从海水中分离到(Stefan *et al.*, 2000),而试验结果显示4条件下溶藻弧菌的粘附量最大,其原因有待进一步研究。

Hood 等(1997)研究结果显示,霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)在酸性条件下,在硅胶上的粘附量多于中性、碱性条件下的粘附量,这与本试验结果一致,这可能是在酸性条件下能增强溶藻弧菌的粘附素与表皮粘液受体的亲和力,而自然海水的pH值偏碱性,这也反映了大黄鱼表皮粘液的一种保护防御能力,能降低海水中溶藻弧菌对表皮粘液的粘附能力。

Balebona 等(1995)研究表明鳗弧菌在盐度35时粘附作用最强,与本试验结果一致,这说明溶藻弧菌的粘附作用与某些离子有关。病原菌除以特异性结合方式粘附于宿主上外,通过二价阳离子连接到宿主上也是重要的结合方式(Hood *et al.*, 1997),本试验结果表明 Ca^{2+} 能显著加强溶藻弧菌的粘附作用,而 Mg^{2+} 作用不明显,因此溶藻弧菌在对大黄鱼表皮粘液的粘附时, Ca^{2+} 起着一定的促进作用。在无 Na^+ 条件下(盐度为0),溶藻弧菌的粘附作用很弱,而0% NaCl的条件下溶藻弧菌可保持3.5h的活性(Belas *et al.*, 1982), Atsumi 等(1992)研究认为 Na^+ 的动势是溶藻弧菌端鞭毛运动的动力源,因此溶藻弧菌的粘附必须在 Na^+ 存在的条件下才能进行,同时 Ca^{2+} 在其粘附作用中起到辅助作用。

根据本文作者研究的结果可认为:病原性溶藻弧菌能够较好地粘附于大黄鱼表皮粘液进而为它的进一步侵入创造有利条件;其粘附作用与温度、盐度、pH等环境因子有着密切关系,这些因

子的改变能显著影响其粘附作用;溶藻弧菌主要以特异性结合方式粘附于宿主表面,还可借助 Ca^{2+} 等二价阳离子进行粘附;大黄鱼有可能通过改变粘液某些理化性质抑制病原性溶藻弧菌的粘附,从而有利于保护自身免受病原菌的侵害。

参 考 文 献

- 林克冰,周 宸,刘家富等,1999.海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的病原菌.台湾海峡,18(3):342—346
- 陈翠珍,房 海,张晓君等,2006.牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)秦皇岛弧菌感染症及其病原细菌研究.海洋与湖沼,37(1):35—40
- 房 海,陈翠珍,张晓君等,2005.牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)细菌败血症及病原检验与分析.海洋与湖沼,36(2):159—166
- 鄢庆彬,王 军,苏永全等,2001.网箱养殖大黄鱼弧菌病研究.集美大学学报(自然科学版),6(3):191—196
- 戴卓捷,杨光明,汪正清,2001.细菌粘附素的分子结构和装配机制.微生物学免疫学进展,29(3):55—59
- Atsumi T, Mccarter L, Imae Y, 1992. Polar and lateral flagellar motors of marine vibrio are driven by different ion-motive forces. Nature, 355: 182—184
- Balebona M C, Morinigo M A, Faris A *et al.*, 1995. Influence of salinity and pH on the adhesion of pathogenic *Vibrio* strains to *Sparus aurata* skin mucus. Aquaculture, 132: 113—120
- Beachey E H, 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. J Infect Dis, 143: 325—345
- Belas M R, Colwell R R, 1982. Adsorption kinetics of laterally and polarly flagellated *Vibrio*. Journal of Bacteriology, 151: 1568—1580
- Bordas M A, Balebona M C, Zorrilla I *et al.*, 1996. Kinetics of adhesion of selected fish-pathogenic vibrio strains to skin mucus of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.). Applied and Environmental Microbiology, 62: 3650—3654
- Chabrilion M, Bordas M A, Morinigo M A *et al.*, 2004. Kinetics of adhesion of *Listonella anguillarum* to the mucus of gilt-head seabream, and the implication of surface components. Aquaculture Research, 35: 403—409
- Ebran N, Julien S, Orange N *et al.*, 1999. Pore-forming properties and antibacterial activity of proteins extracted from epidermal mucus of fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 122: 181—189
- Fouz B, Devesa S, Gravningen K *et al.*, 1990. Antibacterial action of the mucus of the turbot. Bull Eur Assoc Fish Pathol, 10: 56—59
- Garcia T, Otto K, Kjelleberg S *et al.*, 1997. Growth of *Vibrio anguillarum* in Salmon Intestinal Mucus. Applied and Environmental Microbiology, 63: 1034—1039
- Hood M A, Winter P A, 1997. Attachment of *Vibrio cholerae* under various environmental conditions and to selected

- substrates. *FEMS Microbiology Ecology*, 22: 215—223
- John B A, George A I, 1992. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 2: 249—279
- Johnson D W, 1973. Endocrine control of hydromineral balance in teleosts. *Am Zool*, 13: 799—818
- Rosen M W, Cornford E E, 1971. Fluid friction of fish slimes. *Nature*, 234: 49—51
- Vesterlund S, Paltta J, Karp M *et al*, 2005a. Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: Quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. *Research in Microbiology*, 156: 238—244
- Vesterlund S, Paltta J, Karp M *et al*, 2005b. Measurement of bacterial adhesion—*in vitro* evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods*, 60: 225—233
- Smith V J, Fernandes J M O, Jones S J *et al*, 2000. Antibacterial proteins in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish & Shellfish Immunology*, 10: 243—260
- Stefan H, Helmut W, Karin N B *et al*, 2000. Isolation of *Vibrio alginolyticus* from seawater aquaria. *Int J Hyg Environ Health*, 203: 169—175
- Yuehuei H A, Richard J F, 1997. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *Journal of Microbiological Methods*, 30: 141—152

ENVIRONMENTAL INFLUENCE ON ADHESION OF *VIBRIO ALGINOLYTICUS* TO SKIN MUCUS OF *PSEUDOSCIAENA CROCEA*

CHEN Qiang^{1,2}, YAN Qing-Pi^{2,3}, ZOU Wen-Zheng², MA Shen¹,
ZHUANG Zhi-Xia³, WANG Xiao-Ru³

(1. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao, 266003; 2. Fisheries College of Jimei University, Xiamen, 361021; 3. College of Chemistry & Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen, 361005)

Abstract Fish pathogens can colonize and infect the host by attaching bacteria onto host's mucus layer. Study on the attachment and adhesion of a pathogen is important to prevent the host from infection. In this paper, we study the case of pathogen *Vibrio alginolyticus* and host *Pseudosciaena crocea* (large yellow croaker) as an example for better understanding of adhesion of the pathogen to the skin mucus of the host. The mucus samples are extracted from *P. crocea* with protein concentration adjusted at 1mg/ml, using microtiter plate and [methyl-³H] thymidine as the isotope tracer. Our results show that the quantity of *V. alginolyticus* adhesion increases with bacteria concentrations at the equilibrium 180min post-incubation. However, quantity does not reach an equilibrium point when the bacterial concentration ranges from 0.044 to 1.11 (OD_{550}) 90min after incubation at 25 °C; incubation temperature is one of the main factors that affect the bacterial adhesion. *V. alginolyticus* shows stronger adhesion in warm condition reaching the maximum at 25 °C. On the other aspect, pH value affects the bacteria adhesion remarkably. The adhesion is remarkably stronger at pH 3—5 than at pH 7—9, peaked at pH 6. The adhesion fluctuates in seawater with different salinities optimized at 3.5‰. No specific adhesion of *V. alginolyticus* to skin mucus is exhibited in Na⁺-free solution. Existence of Ca²⁺ but Mg²⁺ can obviously promotes the adhesion. All the results suggest that the pathogenic *V. alginolyticus* can adhere to the skin mucus of *P. crocea* easily in seawater; however, environmental factors of temperature, pH and salinity can influence the adhesion effectively. The optimal condition is 25—30 °C, pH about 6, and 3.5‰ in salinity.

Key words *Vibrio alginolyticus*, Adhesion, *Pseudosciaena crocea*, Skin mucus